14-04

-Blunting and Ligation Kit-

Blunting high

(Code No. BLK-101)

取扱説明書

TOYOBO CO., LTD. Life Science Department
OSAKA JAPAN

A3269K

― 目次 ―

ご注意

本キットに含まれる試薬類はすべて研究用試薬です。診断・臨床用試薬として決して使用しないでください。本キットの使用にあたっては、実験室での一般の注意事項を厳守し、安全に留意してください。

［1］ はじめに

Blunting highは、DNA末端の平滑化と、それに続くLigationを行うことができます。本キットは、次のような特長を持っています。

1．KOD DNA Polymeraseを用いて平滑化を行います。

●“KOD”は、超好熱始原菌*Pyrococcus* sp.KOD1株由来の耐熱性DNA Polymeraseです。本酵素の有する5’-3’polymerase活性と3’-5’exonuclease活性により、dNTPsの存在下でDNA末端を平滑化します。

2． 短時間の反応（2min）でDNAを平滑化します。

●過剰に作用させても平滑化には影響はありません。

3． 簡便な操作で、高い効率のBlunt-end Ligationができます。

●“Ligation high”は、1液タイプのLigation Kitです。高い効率のLigationができます。

4． 添付のControl DNAで、平滑化反応とLigation反応の確認ができます。

［2］キットに含まれるもの

キットのパーツ(20回分)

20μl	KOD DNA Polymerase (2.5U/μl)
100μl	10XBlunting Buffer*1
375μl	Ligation high*2
50μl	Control DNA (10ng/μl)*3

*1 10XBlunting Bufferの組成

1.2M	Tris-HCl pH8.0 at 25℃
100mM	KCl
15mM	$MgCl_2$
60mM	$(NH_4)_2SO_4$
2mM	dNTPs
1%	TritonX-100
0.01%	BSA

*2 Ligation highは、-DNA Ligation kit- Ligation high(LGK-101)と同じ組成です。

*3 Control DNAは、*EcoR* Ⅰと*Sph* Ⅰでdouble digestしたpUC18 DNAです。平滑化してLigationすると、アンピシリン耐性遺伝子をコードするplasmid DNAを形成します。

［3］プロトコール

1. 平滑化反応の手順

（1）次の組成で反応液を調製します。

Sample反応

	（μl）
Sample DNA	X
10XBlunting Buffer	1
KOD (2.5U/μl)	1
滅菌水	8-X
	10

Control反応

	（μl）
Control DNA (10ng/μl)	5
10XBlunting Buffer	1
KOD (2.5U/μl)	1
滅菌水	3
	10

（2）72℃, 2min保持します。
(流動パラフィン、ミネラルオイル等の重層は必要ありません)

（3）氷中で冷却します。

（4)反応液はそのままLigation反応に使えます。

2. 効率よい平滑化を行うために

（1）DNAの精製

エタノール沈殿などで、*1TEバッファーに置換したDNAの使用を標準的な操作としていますが、次の方法でも可能です。

●制限酵素処理したDNAの場合：

H,M,L,TAバッファーを用いた反応液であれば、反応液をそのままDNA溶液として用い、上の反応組成で平滑化処理できます。

●TaqでPCRした産物の場合：

PCR後の反応液を一部取り、KODを添加し、72℃, 2min処理します。
このとき、KODは、Taqと同じUnit数を加えます。dNTPsは、反応時の濃度で0.2mMが至適ですので、不足している場合は追加します。10XBlunting Bufferの添加は必要ありません。

---

*1TEバッファー ： 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH8.0

（2）DNA量

●DNA末端10pmolを処理できます。直鎖状pUC18 DNA2.7kbであれば、約10μgに相当します。DNA溶液は、最高8μlまで処理できます。

（3）反応液の調製

●反応液を調製するとき、KODを最後に加えてください。dNTPsが共存しない環境下ではKODの3'-5'exonucleaseが強く作用し、DNAを削ることがあります。

（4）反応時間

●72℃，2minで充分な平滑化反応が行われます。また、標準の反応条件であれば、30minまで時間を延長しても効率は変わりません。

3. Ligation反応の手順

（1）次の組成で反応液を調製します。

Sample反応

	（μl）
平滑化したSample DNA （平滑化反応液）	Y
TEバッファー	10-Y
Ligation high	10
	20

Control反応

	（μl）
平滑化したControl DNA （平滑化反応液 5ng/μl）	2
TEバッファー	8
Ligation high	10
	20

（2）16℃，1hr保持します。

（3）Control反応は、次のように進めます。

●LigationしたDNAで、*E.coli*コンピテントセルを形質転換します。

●アンピシリン含有LB寒天培地にて37℃，overnight培養します。

平滑化してLigationしたControl DNAの形質転換体は、アンピシリン耐性を有しコロニーを形成します。

Control DNAを平滑化してLigationしたときのcfu（colony formation unit）は、平滑化せずにLigationしたときの20倍以上になります。

4. 効率よいLigationを行うために

（1）Ligation highの使用方法

●本品は-20℃で保存してください。

●Ligation highの融解を氷中で行います。5～10minで自然融解します。

●DNA液量と同量のLigation highを混合します。

●16℃にて反応を行います。

●反応液は、反応終了後そのまま形質転換に使用できます。

（2）反応条件

●Ligation反応の16℃以下では、KODはほとんど作用しませんので、KODを失活させる必要はありません。

●Controlの反応組成であれば、Ligation反応は16℃，1hrで最大の効率に達します。

●Ligation highの標準的な使用方法は、反応を16℃，30minとしていますが、本キットの反応が平滑末端のLigationであることと、平滑化反応液組成の持ち込みが反応を阻害することから、1hrの反応時間をお薦めします。

●また、DNA量、あるいは、Ligation反応組成に持ち込む平滑化反応液の量が多くなると、効率が低下する要因になります。
このような場合、反応時間を延長するか（overnightまで）、平滑化反応液をエタノール沈殿などでTEバッファーに置換すると、効率が改善されます。

［4］ベンチサイド プロトコール

1. 平滑化反応

	（μl）
DNA	X
10XBlunting Buffer	1
KOD (2.5U/μl)	1
滅菌水	8-X
	10

↓

72℃，2min

↓

氷冷

2. Ligation反応

	（μl）
平滑化したDNA （平滑化反応液）	Y
TEバッファー	10-Y
Ligation high	10
	20

↓

16℃，1hr

↓

（形質転換など）

［5］関連商品一覧

商品名	Code No.
KOD DNA Polymerase	KOD-101
Ligation high	LGK-101
T4 DNA Polymerase	TPL-101
Klenow Fragment	PLA-111
T4 DNA Ligase	LGA-111
T4 Polynucleotide Kinase	PNK-111
Alkaline Phosphatase(*E.coli*)	BAP-111
Alkaline Phosphatase(Calf intestine)	CAP-101
Competent high *E.coli* JM109	DNA-900
Competent high *E.coli* DH5	DNA-901
Competent high *E.coli* DH5α	DNA-903